

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA LIPOCALINE CHLOROPLASTIQUE AtCHL PROTÈGE *ARABIDOPSIS*
CONTRE LE STRESS OXYDATIF

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

GABRIEL LÉVESQUE TREMBLAY

FÉVRIER 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier François Ouellet pour son soutien essentiel à la réalisation de ce mémoire.

Merci à Fathey Sarhan pour son importante implication.

Merci à mes parents et à toute mon équipe de laboratoire du côté végétal à l'UQAM.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vi
RÉSUMÉ.....	vii
REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.0 INTRODUCTION.....	1
2.0 LES STRESS ABIOTIQUES	2
2.1 <i>La sécheresse</i>	3
2.2 <i>Le stress oxydatif</i>	5
2.3 <i>L'acide abscissique</i>	7
3.0 LES LIPOCALINES	9
3.1 <i>Séquence et structure</i>	9
3.2 <i>Ligands</i>	10
3.3 <i>Rôle d'antioxydant</i>	10
3.4 <i>Lipocalines de plantes</i>	11
3.4.1 <i>Lipocalines Induites par la Température (TIL)</i>	12
3.4.2 <i>Lipocalines Chloroplastiques (CHL)</i>	13
4.0 L'ÉTUDE PRÉSENTE	16
ARTICLE.....	17
ABSTRACT	20
INTRODUCTION.....	21
RESULTS	23
<i>AtCHL is localized in the thylakoid lumen</i>	23
<i>Effect of abiotic stress treatments on AtCHL accumulation</i>	23

<i>AtCHL increases paraquat and drought tolerance</i>	24
<i>AtCHL alleviates membrane lipid peroxidation</i>	25
DISCUSSION	26
MATERIALS AND METHODS	29
<i>Plant growth conditions and treatments</i>	29
<i>Isolation and fractionation of intact chloroplasts</i>	31
<i>Immunoblot and RT-PCR analyses</i>	32
<i>Lipid peroxidation assays</i>	33
ACKNOWLEDGMENTS.....	33
FIGURES	34
CONCLUSION.....	44
RÉFÉRENCES	47

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Subcellular localization of AtCHL.	48
Figure 2. Effect of abiotic stresses on the expression of AtCHL.	50
Figure 3. Modulation of the AtCHL protein level and phenotypic analysis.	52
Figure 4. Effect of dehydration and oxidative stresses on the different <i>Arabidopsis</i> lines.	54
Figure 5. Lipid peroxidation assays.	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABA	acide abscissique
AtCHL	“ <i>Arabidopsis thaliana</i> chloroplastic lipocalin”, lipocaline chloroplastique d’ <i>Arabidopsis</i>
AtTIL	“ <i>Arabidopsis thaliana</i> temperature-induced lipocalin”, lipocaline induite par la température chez <i>Arabidopsis</i>
Comp	“complementation line”, lignée de complémentation
DH	“dehydration”, sécheresse
HL	“high light”, haute intensité lumineuse
KO	“knock-out line”, lignée de sous-expression
LTP3	“Lipid Transfer Protein 3”, protéine de transfert de lipides 3
MDA	malondialdehyde
OEX	“overexpressing line”, lignée de surexpression
ROS	“reactive oxygen species”, espèces réactives d’oxygène”
SCR	“structurally conserved regions”, régions structurellement conservées
TaCHL	“ <i>Triticum aestivum</i> chloroplastic lipocalin”, lipocaline chloroplastique de blé
TaTIL	“ <i>Triticum aestivum</i> temperature-induced lipocalin”, lipocaline induite par la température chez le blé
WT	“wild-type plants”, plantes de souche sauvage

RÉSUMÉ

Les lipocalines sont des petites protéines de structure tertiaire simple qui ont l'habileté de lier de petites molécules généralement hydrophobes. De récentes études ont montré que les lipocalines animales jouent un rôle important dans la régulation du développement et sont impliquées dans la tolérance au stress oxydatif. Les plantes possèdent aussi des types variés de lipocalines. Les analyses bioinformatiques ont prédit que certains membres pourraient être localisés dans le chloroplaste, suggérant une fonction dans la protection de l'appareil photosynthétique lors de conditions de stress oxydatif. Ce travail présente la caractérisation fonctionnelle de la lipocaline chloroplastique AtCHL chez *Arabidopsis thaliana*. Un fractionnement cellulaire a montré qu'AtCHL est une protéine du lumen des thylacoïdes. La sécheresse, les hautes intensités lumineuses, et le traitement au paraquat et à l'acide abscissique induisent l'accumulation du messager et de la protéine AtCHL. Sous des conditions normales de croissance, les lignées de type sauvage, de sous- (KO) et sur- (OEX) expression ne montrent pas de différence au niveau phénotypique même si elles montrent des niveaux d'accumulation d'AtCHL dramatiquement différents. Lors d'un stress de sécheresse ou un stress oxydatif, l'absence d'AtCHL dans les plantes KO mène à plus de dommages alors qu'un haut niveau d'AtCHL permet aux plantes OEX de mieux surmonter les stress. Le niveau d'accumulation d'AtCHL est inversement proportionnel au niveau de lipides peroxydés. Ces résultats montrent qu'AtCHL est vraisemblablement impliquée dans la protection des lipides, localisés du côté luménal des thylacoïdes, contre les espèces réactives d'oxygène générées sous les stress de sécheresse et oxydatif.

Mots-clés: chloroplaste, peroxydation des lipides, lipocalines, tolérance aux stress, stress oxydatif

REVUE DE LITTÉRATURE

1.0 INTRODUCTION

Les plantes sont d'une importance globale pour la vie sur la Terre. Elles représentent la principale source de carbone et un producteur de l'oxygène que l'on respire. Elles sont aussi une source de fibres, carburants, médicaments, aliments et matériaux. La croissance démographique que nous connaissons actuellement engendre un besoin croissant envers la ressource importante que représente le règne des végétaux. La modernisation des méthodes agricoles et de croisements a permis jusqu'ici d'augmenter considérablement le niveau de production des cultures, mais ces méthodes requièrent beaucoup de ressources et de temps, en plus d'être très coûteuses. Ces limitations pourraient être adressées avec le développement de marqueurs permettant de sélectionner les meilleures variétés par croisements traditionnels ou encore par les transformations génétiques. Ces approches pourraient permettre d'assurer la présence de plusieurs gènes impliqués dans la résistance envers différents stress biotiques et abiotiques afin de diminuer les dommages causés par ces stress chez les espèces plus sensibles ayant une valeur économique considérable.

L'amélioration des cultivars requiert une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires impliqués dans la résistance au stress. Les sections suivantes résument l'état des connaissances générales et actuelles de ces différents mécanismes.

2.0 LES STRESS ABIOTIQUES

Les basses températures hivernales, les chaleurs extrêmes de l'été, la sécheresse, les radiations élevées, la salinité et la pollution de l'air et des sols ne sont que quelques exemples de ce à quoi une plante doit faire face. Dans l'environnement, des conditions qui génèrent des stress sont créées lorsque les paramètres environnementaux atteignent des valeurs extrêmes. Il peut en résulter des impacts importants sur la physiologie, le développement et la survie des plantes. Bien que la terminologie existante ne fasse pas l'unanimité chez tous les scientifiques, la définition qui peut être la plus pertinente d'un stress biologique serait : une force ou une influence hostile qui tend à empêcher un système de fonctionner normalement (Jones and Jones, 1989).

Avec le réchauffement climatique, la pression exercée par certains stress augmentera très certainement. La sécheresse, par exemple, est déjà l'un des principaux facteurs limitant la productivité des récoltes en Amérique du Nord et à l'échelle mondiale (Boyer, 1982; Bartels and Nelson, 1994). Augmenter la résistance des cultures au stress de sécheresse pourrait être l'approche la plus économique pour améliorer la productivité en agriculture et réduire l'utilisation des ressources d'eau douce (Xiong et al., 2006). Le stress oxydatif, quant à lui, peut être causé directement par les oxydants atmosphériques ou indirectement dans les réponses initiées par une multitude d'autres stress. Il est reconnu que le stress oxydatif représente aussi l'une des principales causes de la baisse de production en agriculture (Foyer and Noctor, 2005).

2.1 La sécheresse

La sécheresse provoque des dommages qui résultent de la dessiccation du protoplasme. La sortie de l'eau de la cellule provoque une augmentation de la concentration des solutés, entraînant des conséquences sérieuses tant sur le plan structural que sur le plan métabolique. L'intégrité des membranes et des protéines est également affectée par la dessiccation, ce qui entraîne des dysfonctionnements métaboliques. Les protéines cytoplasmiques et les organites peuvent ainsi subir d'importantes pertes d'activité ou être complètement dénaturés lorsqu'ils sont déshydratés. La photosynthèse et la croissance cellulaire sont parmi les premiers processus affectés lors de la sécheresse (Chaves et al., 2008). L'effet peut être direct, comme la diminution de la disponibilité en CO_2 causée par la limitation de la diffusion dans le mésophylle (Flexas et al., 2004; Flexas et al., 2007), l'altération du métabolisme photosynthétique (Lawlor and Cornic, 2002), ou par le stress oxydatif. Lors de sécheresse, la déficience en CO_2 intracellulaire résulte en une sur-réduction des composantes de la chaîne de transport d'électrons et les électrons sont transférés à l'oxygène au niveau du photosystème I (PS I). Ce transfert mène à la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Lors de conditions sévères de sécheresse, le déclin de la photosynthèse est aussi dû à une diminution de l'activité de la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) (Mahajan and Tuteja, 2005).

Bien que le stress hydrique soit généralement causé par une baisse d'humidité ou un manque de précipitation, il est aussi provoqué par le gel. Puisque le point de congélation de l'eau extracellulaire est plus élevé que celui de l'eau intracellulaire, le gel provoque la formation de cristaux de glace en premier lieu à l'extérieur de la cellule végétale. Le gradient de potentiel hydrique entre l'eau intra- et extracellulaire provoque le déplacement de l'eau intracellulaire vers l'extérieur de la cellule, ayant pour conséquence une déshydratation. C'est pourquoi la cellule réajuste la dimension

de ses membranes au cours du gel (Steponkus, 1984). La diminution du volume cytoplasmique et la déshydratation à la surface des membranes (survenant de -4 à -10°C) peuvent aussi provoquer un rapprochement des membranes plasmiques et chloroplastiques. Puisque ces dernières ont une composition lipidique différente, un mélange se produit et on assiste à la formation de vésicules lipidiques mixtes de type phase hexagonale II. Lorsque la température redevient élevée, ces vésicules mixtes fusionnent aux différentes membranes et changent leur composition et leur fluidité, les rendant dysfonctionnelles et plus sensibles aux bris (Steponkus, 1984).

Les plantes possèdent divers mécanismes de résistance contre le stress de sécheresse. Lors d'un déficit en eau, les stomates se ferment, la biosynthèse d'osmolytes particuliers augmente, la balance de ces métabolites et la consommation, le partitionnement et la séquestration des ions change, la composition des membranes est modifiée, et une cascade de signalisation est initiée (Bohnert et al., 1995). La réponse d'acclimatation lors du stress de sécheresse inclut aussi l'inhibition de la croissance et la desquamation des feuilles, ce qui restreint la dépense en eau des tissus sources et aide à maintenir le statut en eau et l'assimilation de CO₂ chez la plante. Les composés osmotiques comme les sucres et autres osmolytes sont aussi produits en réponse à une lente induction de la déshydratation, et ont une fonction dans le maintien de l'activité métabolique des tissus. Certains de ces mécanismes sont générés par les changements dans la transcription, la stabilité des ARNm et la dégradation des protéines qui se produisent en période de sécheresse (Bohnert et al., 1995). Plusieurs travaux ont porté sur l'étude de la réponse moléculaire des plantes envers le stress de déficit en eau, en utilisant la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Ingram and Bartels, 1996; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Plusieurs gènes répondent à la sécheresse au niveau de la transcription et leurs produits ont probablement une fonction dans la réponse et la tolérance à ce stress (Bray, 1993; Bohnert et al., 1995; Ingram and Bartels, 1996; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki,

2000). En fait, ce sont environ 2000 gènes qui sont exprimés en réponse à la sécheresse chez *Arabidopsis* et la plupart de ceux-ci retrouvent une expression normale après une période de récupération (Huang et al., 2008). Un bon nombre de gènes qui sont inductibles par le stress de sécheresse sont exprimés dans les tissus végétatifs et plusieurs d'entre eux sont aussi induits par l'acide abscissique (ABA) (Ingram and Bartels, 1996; Seki et al., 2002).

2.2 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est induit par plusieurs facteurs environnementaux comme les hautes et basses températures, les ultraviolets, l'excès de lumière, les pathogènes, les oxydants atmosphériques, les herbicides, le manque d'oxygène et la sécheresse. En fait, la caractéristique commune de l'imposition d'un stress environnemental sur les tissus végétaux est l'augmentation du niveau de production de ROS potentiellement dommageables (Bowler et al., 1992; Chen et al., 1993; Asada, 1999). La majorité de ces ROS sont générées par l'activation de molécules d'oxygène. L'excitation d'O₂ entraîne ainsi la formation de ROS comme l'oxygène singulet (¹O₂). Les radicaux libres superoxydes (O₂⁻), les radicaux hydroxyles (OH•) et les molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'ozone (O₃) sont d'autres ROS très dommageables pour les organismes vivants (Mittler, 2002). Les ROS ont divers effets néfastes pour les cellules. Elles affaiblissent les membranes au niveau des lipides par peroxydation des acides gras insaturés, dénaturent les protéines, et endommagent les hydrates de carbone et les acides nucléiques.

Les ROS peuvent être produites dans plusieurs compartiments cellulaires et leur génération est une conséquence inévitable du métabolisme des organismes vivants. Le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde sont tous deux souvent produits par de nombreuses réactions enzymatiques catalysées par des lipooxygénases, des

peroxydases, des NADPH oxydases et des xanthines oxydases. La majeure partie des ROS est en général produite dans le chloroplaste (Asada, 1999). C'est spécifiquement la chaîne de transport d'électrons photosynthétique (PETC) des thylacoïdes du chloroplaste qui est considérée comme la principale source de ROS chez les plantes supérieures (Ivanov and Khorobrykh, 2003). La quantité de ROS produites par la PETC augmente en situation de stress (Krieger-Liszkay and Trebst, 2006). Sous ces conditions, le potentiel du système de transport d'électrons excède la demande de réduction équivalente et d'ATP, dans le cycle d'assimilation du carbone. Il est possible que cet excès limite les réactions subséquentes permettant l'exportation du carbone réduit dans le chloroplaste vers les autres compartiments cellulaires. Dans ce cas, le flux d'électrons est saturé et le pool de plastoquinone devient complètement réduit. Avant que l'acclimatation réajuste le système photosynthétique à la nouvelle situation, une grande quantité de ROS est générée en conséquence de la surcharge du système de transport d'électrons (Ort and Baker, 2002). En fait, dans la réaction de Mehler, l'accepteur primaire du PSI réagit avec l'oxygène quand le système ferredoxine-NADP est déjà réduit. Des radicaux anions superoxydes et du H_2O_2 sont ainsi conséquemment produits. Ces ROS sont relâchées dans le compartiment du stroma où ils rencontrent un système efficace d'antioxydants comme la ferredoxine, le NADPH, la thioredoxine, et le cycle ascorbate-glutathion (Foyer and Noctor, 2005).

L'étendue des dommages liés au stress oxydatif dépend de la capacité de la plante à induire des mécanismes de protection appropriés. La tolérance des plantes aux facteurs environnementaux qui provoquent un stress oxydatif est assurée par l'augmentation du niveau de différents antioxydants et enzymes de détoxification dans la plante (Mittler, 2002). Une enzyme clé du réseau d'antioxydants est représentée par les ascorbate peroxydases (APXs), qui catalysent la réduction du H_2O_2 en eau utilisant l'ascorbate comme donneur d'électrons (Asada, 1999). Il existe d'autres enzyme récupératrices de ROS comme les superoxide dismutases

chloroplastiques Fe-SOD et Cu/Zn-SOD, la superoxide dismutase mitochondriale Mn-SOD, la monodéhydroascorbate réductase, la glutathion réductase et la glutathion peroxydase (Karpinski et al., 1997).

La présence de ROS dans la plante déclenche les voies de signalisation influençant l'expression des gènes de résistance envers le stress oxydatif (Bechtold et al., 2008). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est d'ailleurs l'une des principales ROS générées dans la plante sous condition de stress (Asada, 1999). Bien que dommageable, il est aussi responsable de l'initiation de la réponse à un éventail de stress incluant l'acclimatation à l'excès de lumière (Karpinski et al., 1999), la résistance systémique aux pathogènes (Alvarez et al., 1998) et la récupération suite aux blessures (Orozco-Cardenas and Ryan, 1999). L'accumulation du H_2O_2 sous ces conditions de stress semble spécifique aux chloroplastes des cellules des tissus vasculaires (Orozco-Cardenas et al., 2001; Fryer et al., 2003; Chang et al., 2004; Mateo et al., 2004; Mullineaux et al., 2006). Il a aussi été suggéré que l'augmentation du H_2O_2 à proximité du système vasculaire serait impliquée dans un signal de défense systémique dans la plante (Karpinski et al., 1999; Fryer et al., 2002; Bechtold et al., 2008).

2.3 L'acide abscissique

Les étapes impliquées dans la biosynthèse *de novo* de l'acide abscissique (ABA) chez les plantes ont été étudiées de façon intensive depuis plus d'une décennie (Nambara et al., 1998). Il est maintenant établi que l'ABA est synthétisé dans le chloroplaste par la voie des xanthophylles à partir de la zéaxanthine, un caroténoïde C40 (Seo and Koshiba, 2002; Schwartz et al., 2003; Xiong and Zhu, 2003). La phytohormone ABA régule plusieurs processus physiologiques essentiels incluant l'inhibition de la germination, le maintien de la dormance des graines et le contrôle de

la fermeture des stomates (Finkelstein et al., 2002). L'ABA joue aussi un rôle central dans la réponse aux stress autant abiotiques que biotiques comme la sécheresse, la salinité, les basses températures et les attaques par des pathogènes (Zeevaart and Creelman, 1988; Zhu, 2002; de Torres-Zabala et al., 2007).

L'ABA agirait comme signal dans l'acclimatation aux différents stress abiotiques (Bechtold et al., 2008). On observe d'ailleurs une augmentation de la quantité de H_2O_2 après un traitement à l'ABA (Guan et al., 2000; Pei et al., 2000; Jiang and Zhang, 2001) coïncidant avec l'induction de l'expression des gènes codant pour des enzymes de détoxification comme les SODs, APXs et catalases (Sakamoto et al., 1995; Kaminaka et al., 1999). Ces différentes études suggèrent que les cascades de signalisation induites par l'ABA et le H_2O_2 seraient responsables, à elles seules, d'une part importante de la réponse aux stress abiotiques.

Il est connu que l'ABA et ses métabolites augmentent significativement lors d'un stress de sécheresse (Huang et al., 2008). Ces changements dans le niveau d'ABA cellulaire génèrent l'activation de nombreux gènes répondant aux stress, dont ceux responsables de la fermeture des stomates, pour restreindre la transpiration (Schroeder et al., 2001; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Récemment, il a été démontré que l'ABA s'accumule dans les feuilles soumises à un stress de haute intensité lumineuse (HL) (Rossel et al., 2006). D'ailleurs, plus de la moitié des gènes connus pour répondre au stress de HL sont affectés dans leur expression lorsque la plante est traitée à l'ABA (Bechtold et al., 2008). Le fait que l'ABA joue un rôle important dans la signalisation de l'expression des gènes qui répondent aussi bien à la HL qu'à la sécheresse met l'accent sur un lien de plus en plus étroit entre le potentiel hydrique des feuilles et la capacité à dissiper l'énergie d'excitation (Fryer et al., 2003). L'important stress oxydatif causé par la HL et le stress hydrique serait donc étroitement lié dans la réponse qu'ils produisent dans la plante.

3.0 LES LIPOCALINES

Les lipocalines forment un large groupe très diversifié de petites protéines souvent extracellulaires qui sont présentes chez les animaux vertébrés et invertébrés, les plantes et les bactéries. Chez les animaux, elles sont probablement impliquées dans plusieurs fonctions importantes comme la modulation de la croissance cellulaire et du métabolisme, la liaison aux récepteurs de la surface cellulaire, la croissance et la régénération des nerfs, la régulation de la réponse immunitaire, l'odorat, la coloration cryptique, la biosynthèse et la réparation des membranes, l'induction de l'apoptose, le comportement animal et la réponse aux stress environnementaux (Akerstrom et al., 2000; Bishop, 2000). Les protéines constituant cette famille ont la particularité de lier des ligands et présentent des similarités dans leurs structures primaire, secondaire et tertiaire ainsi que dans leur mode d'action (Pervaiz and Brew, 1985; Flower, 1996).

3.1 Séquence et structure

La grande famille des lipocalines a été définie principalement sur la base de l'homologie de séquences. À première vue, les membres de cette famille possèdent des séquences alignées différentes. Néanmoins, elles partagent de courtes séquences conservées qui leur confèrent des propriétés spécifiques. La majorité des lipocalines possèdent trois motifs distincts, mais certaines n'en possèdent qu'un ou deux. Ces motifs sont nommés régions structurales conservées ou "structurally conserved regions" (SCR) (Flower, 1995; Flower, 1996). Chaque lipocaline possède au moins le premier motif (SCR1) qui constitue la partie ubiquitaire de ces protéines.

L'analyse phylogénique des lipocalines est possible à cause de leur structure tridimensionnelle hautement conservée (Ganforina et al., 2000). Cette dernière est par ailleurs très bien caractérisée (Flower et al., 1993; Flower, 1995; Flower, 1996).

Le repliement des lipocalines forme un baril- β hautement symétrique composé de huit feuillets- β antiparallèles reliés entre eux par des ponts hydrogènes. Ce baril- β renferme un site de liaison aux ligands composé d'une cavité interne hydrophobe et d'une boucle externe surplombant la partie ouverte de la cavité (Flower et al., 2000). La diversité structurale des cavités donne lieu à une variété de spécificités de liaison, chacune capable de traiter des ligands de différentes grosseurs et formes avec différents caractères chimiques (Flower et al., 2000).

3.2 Ligands

Les lipocalines lient généralement de petits ligands hydrophobes comme les rétinoïdes, les acides gras, les stéroïdes, les odorants et les phéromones, et interagissent avec les récepteurs de la surface cellulaire (Flower, 2000; Flower et al., 2000). La vaste sélection de molécules pouvant être liées par les lipocalines permet d'envisager un rôle général dans le transport, que ce soit pour retirer des molécules indésirables ou apporter des composés nécessaires au maintien ou à la réparation cellulaire (Åkerstrom et al., 2000; Allhorn et al., 2005). Certains membres de la famille, telle la lipocaline $\alpha 1$ -Microglobuline, possèdent la capacité de lier et de détoxifier le groupement hème et d'autres produits d'oxydation générés par les ROS (Allhorn et al., 2003; Larsson et al., 2004; Allhorn et al., 2005).

3.3 Rôle d'antioxydant

On sait maintenant que pour accomplir leur rôle antioxydant chez les animaux, les lipocalines utilisent trois principaux mécanismes : la récupération des groupements hèmes et autres pro-oxidants, l'inhibition des réactions oxydatives et la réduction enzymatique des produits oxydatifs toxiques (Åkerstrom and Logdberg, 2006). Il a d'ailleurs été récemment démontré que la lipocaline Lazarillo possède un

rôle protecteur contre les conditions de stress oxydatif et que son absence se traduit par une augmentation de la peroxydation des lipides, une réduction de la durée de vie et une accélération de la neurodégénération chez la drosophile (Sanchez et al., 2006). D'un autre côté, sa surexpression protège contre les effets de la famine, l'hypoxie et l'hyperoxie, et augmente la durée de vie de la mouche (Walker et al., 2006). Tout ceci permet d'imaginer un possible rôle de détoxification lors de conditions de stress oxydatif. Par ailleurs, les plantes possèdent un appareil photosynthétique qui, sous l'influence de certains stress abiotiques ou à un niveau moindre en condition normale, provoque la formation de ROS. Dans ce sens, certaines évidences suggèrent que les lipocalines de plantes joueraient un rôle de protection important contre les dommages provoqués par les stress oxydatifs.

3.4 Lipocalines de plantes

Les premières protéines de plantes qui ont été classées comme lipocalines sont la violaxanthine dé-époxydase (VDE) et la zéaxanthine époxydase (ZEP) (Gutierrez et al., 2000). Toutefois, leur véritable appartenance à la famille des lipocalines est toujours controversée puisqu'elles ne partagent seulement que quelques unes des propriétés structurales des membres de la famille des lipocalines (Salier, 2000). Les VDEs et ZEPs sont localisées dans le chloroplaste et sont les enzymes clés du cycle des xanthophylles, lequel sous condition de stress forme la zéaxanthine qui protège l'appareil photosynthétique contre les effets d'un excès de lumière (Havaux and Kloppstech, 2001). Cette même zéaxanthine est aussi le précurseur dans la synthèse de l'ABA comme nous l'avons vu précédemment.

L'identification et le clonage des premières vraies lipocalines de plantes ont récemment été rapportés (Frenette Charron et al., 2002). Une étude bioinformatique subséquente a permis de révéler, chez différentes espèces de plantes, l'existence de

plusieurs autres lipocalines qui ont été classées en deux catégories (Charron et al., 2005).

3.4.1 Lipocalines Induites par la Température (TIL)

Les lipocalines induites par la température ("Temperature-Induced Lipocalins"; TILs) ont été récemment identifiées chez *Arabidopsis thaliana* (AtTIL) et *Triticum aestivum* (TaTIL) (Frenette Charron et al., 2002). Ces auteurs ont montré que le niveau d'ARNm de TaTIL augmente lors de l'exposition à de hautes et basses températures. Le niveau d'expression de TaTIL est corrélé avec la capacité des plantes à développer une tolérance au gel. En effet, le niveau d'ARNm TaTIL est plus élevé chez les variétés de blé plus tolérantes au gel que chez les variétés moins tolérantes. Dans le même sens, le niveau d'ARNm est moins élevé chez l'orge et l'avoine, deux espèces moins tolérantes que le blé. L'analyse de la région promotrice de AtTIL et TaTIL a révélé la présence de plusieurs éléments de réponse aux basses températures (LTREs), éléments de réponse à la déshydratation (DREs), et éléments de réponse au choc thermique (HSEs) (Charron and Sarhan, 2006). Tel qu'observé pour d'autres lipocalines telles Blc et Lazarillo (Bishop, 2000), AtTIL s'accumule spécifiquement à la membrane plasmique (Charron et al., 2005). Cependant, la nature de cette association ou attachement est encore inconnue. Il est connu que les stress de température induisent des dommages aux membranes (Kawamura and Uemura, 2003). Les lipocalines ancrées dans les membranes, donc possiblement TaTIL et AtTIL, semblent toutes être exprimées en réponse aux conditions qui causent des stress aux membranes, suggérant un rôle biologique dans la biosynthèse, la protection et/ou la réparation des membranes sous des conditions de stress sévères (Bishop, 2000).

Tout récemment, le rôle des lipocalines TILs s'est éclairci. Des travaux ont montré que la lipocaline AtTIL chez *Arabidopsis thaliana* est impliquée dans la modulation

de la tolérance envers le stress oxydatif (Charron et al., 2008). Les plantes qui n'expriment pas AtTIL sont très sensibles aux soudaines baisses de température. De plus, l'absence d'AtTIL provoque une accumulation de grandes quantités de H_2O_2 qui causent un stress oxydatif nuisible pour la croissance normale de la plante. Inversement, la surexpression d'AtTIL augmente la tolérance au stress oxydatif provoqué par le paraquat, les basses températures et la lumière. La surexpression d'AtTIL provoque un délai dans la floraison et un maintien de la couleur verte du feuillage dans les stades tardifs de la croissance, suggérant que le cycle de vie de la plante est allongé (Charron et al., 2008). Ces découvertes concordent avec des résultats publiés récemment montrant que la surexpression de la lipocaline humaine ApoD augmente la tolérance au stress oxydatif et allonge la durée de vie chez la souris et la drosophile (Ganforina et al., 2008; Muffat et al., 2008).

3.4.2 Lipocalines Chloroplastiques (CHL)

Le second groupe de lipocalines a été nommé "Chloroplastic Lipocalins" (CHL). Les analyses bioinformatiques ont révélé son existence chez au moins huit espèces de plantes dont quatre monocotylédones (*Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*), et quatre dicotylédones (*Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Ipomoea nil*, *Solanum tuberosum*) (Charron et al., 2005).

Les CHLs partagent 25% d'identité et 35% de similarité avec TaTIL (Frenette Charron et al., 2002). Les homologues CHLs codent pour des protéines de 328 à 340 acides aminés avec une masse moléculaire de 36 à 39 kDa. Les logiciels SignalP et ChloroP prédisent avec un score élevé un peptide transit amino-terminal ciblant les protéines au chloroplaste. Par contre, la longueur exacte du peptide transit chloroplastique et la localisation de la protéine dans le chloroplaste restent encore à déterminer. Un alignement de séquences prédit un site de clivage du peptide transit

chloroplastique près du début du SCR1, et la protéine mature après clivage aurait une masse moléculaire de 26 kDa (Charron and Sarhan, 2006). Une récente analyse du protéome des thylakoïdes chez *Arabidopsis thaliana* a suggéré la présence d'une lipocaline dans le lumen des thylakoïdes (Peltier et al., 2004). Toutes les CHLs semblent aussi posséder 8 résidus cystéine conservés qui sont probablement impliqués dans la structure tridimensionnelle de la protéine par la formation de ponts disulfures.

Le niveau d'ARNm TaCHL est réduit par le choc de hautes températures tandis que les stress de salinité et de déshydratation ne provoquent aucun changement (Charron et al., 2005). Les ARNm TaCHLs s'accumulent durant l'acclimatation au froid seulement chez les espèces de blé tolérantes au gel, associant ainsi leur accumulation avec la capacité de ces plantes à tolérer le gel. C'est à 6 jours d'acclimatation au froid que TaCHL atteint son accumulation maximale, qui décline au niveau normal si on désacclimate les plantes par la suite. Il semble donc que TaCHL soit possiblement nécessaire très tôt dans la période d'acclimatation.

Une récente publication démontre l'interaction entre TaCHL et la Lipid Transfer Protein 3 cytoplasmique (LTP3) (Tardif et al., 2007). Les LTPs sont largement répandues dans le règne végétal et forment une famille multigénique de protéines, mais leur capacité à lier et transférer les lipides *in vitro* n'a été démontrée que chez un nombre limité de protéines. La plupart des membres de cette famille ont été identifiés sur la base d'homologie de séquence (Boutrot et al., 2008). Ce sont généralement de petites protéines basiques caractérisées par 8 résidus cystéine formant quatre ponts disulfures qui stabilisent une cavité hydrophobe permettant la liaison avec différents lipides et autres composés hydrophobes (Douliez et al., 2000). Puisque les LTPs se sont montrées capables de transférer les molécules lipidiques entre les membranes *in vitro*, il a été initialement suggéré qu'elles seraient impliquées dans la biosynthèse des

membranes (Kader et al., 1984). Elles seraient plutôt impliquées dans la sécrétion de matériel lipophile (Sterk et al., 1991) et participeraient aux mécanismes de défense des plantes (Boutrot et al., 2008).

Bien que la fonction de la lipocaline TaCHL soit encore inconnue, certaines hypothèses sont suggérées par la liaison entre TaCHL et la LTP3. L'analyse du réseau possible entre ces deux protéines suggère que TaCHL pourrait avoir une implication au niveau des lipides. La possible liaison de la lipocaline de plante AtTIL avec les lipides a déjà été suggérée (Tominaga et al., 2006). Il est possible que TaCHL joue un rôle direct, ou indirect par la liaison avec la LTP3, dans le transfert de lipides membranaires.

Le deuxième membre des lipocalines identifiées chez *Arabidopsis* a été nommé AtCHL. Cette protéine avait préalablement été identifiée chez cette espèce comme une possible lipocaline (CAB41869) (Hieber et al., 2000). L'analyse d'homologie de séquences a révélé que AtCHL partage seulement 23% d'identité et 40% de similarité avec AtTIL (Charron et al., 2005). Elle possède les trois SCRs caractéristiques des lipocalines (SCR1, SCR2, SCR3). Comme elle représente une nouvelle lipocaline susceptible d'être elle aussi impliquée dans le mécanisme d'acclimatation et de tolérance aux stress abiotiques, AtCHL se doit d'être caractérisée. De plus, *Arabidopsis thaliana* étant un modèle important pour le règne végétal, il est possible que cette caractérisation offre un nouvel élément clé dans notre compréhension du mécanisme global de la réponse aux stress chez les végétaux.

4.0 L'ÉTUDE PRÉSENTE

AtCHL est donc un candidat intéressant dans l'étude de la tolérance aux stress abiotiques. Ceci s'inscrit dans une stratégie globale d'amélioration de la tolérance des plantes. Afin de caractériser davantage les mécanismes moléculaires, physiologiques et biochimiques associés à l'acquisition de la tolérance aux stress abiotiques, j'ai entrepris de déterminer la fonction de la lipocaline AtCHL chez la plante-modèle *Arabidopsis thaliana*. L'implication des lipocalines autant animales que végétales dans la tolérance au stress oxydatif et la localisation chloroplastique probable des lipocalines CHLs laissent croire qu'AtCHL pourrait avoir une fonction dans la protection de la machinerie photosynthétique chez *Arabidopsis*.

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai effectué une caractérisation phénotypique et moléculaire de plantes de différentes lignées exprimant des niveaux variables d'AtCHL. J'ai premièrement vérifié la localisation d'AtCHL dans le chloroplaste en effectuant un fractionnement cellulaire. J'ai ensuite déterminé le profil d'expression de la lipocaline AtCHL au niveau de l'ARNm et de l'accumulation des protéines lors de divers traitements provoquant des stress abiotiques. Afin de vérifier si AtCHL protège vraiment la cellule, j'ai finalement quantifié les lipides endommagés par les divers traitements. Différentes techniques de biologie moléculaire et de biochimie ont été utilisées, et les résultats obtenus font l'objet d'un manuscrit qui sera soumis bientôt pour publication.

ARTICLE

THE CHLOROPLASTIC AtCHL LIPOCALIN PROTECTS *ARABIDOPSIS* AGAINST DROUGHT AND OXIDATIVE STRESS

Gabriel Levesque-Tremblay et Francois Ouellet

Soumis en Septembre 2008 à la revue *Plant and Cell Physiology*

J'ai été impliqué dans toutes les facettes des travaux associés à cet article. J'ai participé à l'élaboration du design expérimental et effectué toutes les manipulations au laboratoire ainsi que toutes les analyses. J'ai finalement rédigé la première version du manuscrit et conçu les figures. François Ouellet a participé à l'élaboration du projet et du design expérimental, et à l'interprétation des résultats. Il a de plus supervisé la rédaction du manuscrit.

Running Title: CHLOROPLASTIC LIPOCALIN AND STRESS TOLERANCE

Corresponding author:

Francois Ouellet

Université du Québec à Montréal

Département des Sciences biologiques

Case Postale 8888, Succursale Centre-ville

Montreal Quebec H3C 3P8

Canada

E-mail: ouellet.francois@uqam.ca

Phone: 1-514-987-3000, ext. 8402

Fax: 1-514-987-4647

Subject Areas: (2) Environmental and stress response

Number of black and white figures: 3

Number of color figures: 2

**THE CHLOROPLASTIC AtCHL LIPOCALIN PROTECTS *ARABIDOPSIS*
AGAINST DROUGHT AND OXIDATIVE STRESS**

Gabriel Levesque-Tremblay and Francois Ouellet

Université du Québec à Montréal
Département des Sciences biologiques
Case Postale 8888, Succursale Centre-ville
Montreal Quebec H3C 3P8
Canada

Arabidopsis thaliana chloroplastic lipocalin (AtCHL), abscisic acid (ABA), wild-type (WT), knock-out (KO), overexpressing (OEX), temperature-induced lipocalins (TILs), chloroplastic lipocalins (CHLs), reactive oxygen species (ROS), hydrogen peroxide (H₂O₂), complementation line (Comp)

ABSTRACT

Lipocalins are small ligand-binding proteins with a simple tertiary structure giving them the ability to bind small, usually hydrophobic molecules. Recent studies showed that animal lipocalins play important roles in the regulation of developmental processes and are involved in tolerance to oxidative stress. Plants also possess various types of lipocalins. Bioinformatics analyses predicted that lipocalin members may also be present in the chloroplast. Here we report on the functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic lipocalin AtCHL. Cellular fractionation showed that AtCHL is a thylakoid lumenal protein. Drought, high light, paraquat and abscisic acid treatments induce AtCHL transcript and protein accumulation. Under normal growth conditions, wild-type, knock-out (KO) and overexpressing (OEX) lines show no phenotypical differences even though they show dramatic differences in AtCHL protein accumulation. The absence of AtCHL in KO plants leads to more damage upon drought and oxidative stress, possibly as a result of the higher levels of peroxidated lipids. In contrast, a high level of AtCHL allows OEX plants to better cope with these stresses. This is probably due to the protection of lipids against peroxidation. This work provides evidence suggesting that AtCHL is involved in the protection of thylakoidal membrane lipids against reactive oxygen species produced upon drought and oxidative stresses.

KEY WORDS: chloroplast, lipid peroxidation, lipocalin, paraquat, stress tolerance, thylakoid lumen

INTRODUCTION

Lipocalins are small ligand-binding proteins found in bacteria and in invertebrate and vertebrate animals (Sanchez et al., 2006). They show a simple tertiary structure which gives them the ability to bind small, generally hydrophobic, molecules. Animal lipocalins play important roles in the regulation of immunological and developmental processes, and they are involved in the responses of organisms to various stress factors and in signal transduction pathways. The insect glial *Lazarillo* lipocalin has a protective role against oxidative stress conditions and its absence increases lipid peroxidation and reduces life span in *Drosophila* (Sanchez et al., 2006). On the other hand, its overexpression protects the fly against the effect of starvation, hypoxia and hyperoxia, and extends the fly's life span (Walker et al., 2006). Given the major roles played by these proteins in animal systems, it is important to determine if they are present in plant systems and what function they may have. As part of our efforts to identify abiotic stress-induced genes, we have cloned the first true lipocalins from plants (Frenette Charron et al., 2002).

Data mining of genomic databases and bioinformatics predictions allowed us to determine that many plants possess lipocalins, and these proteins were classified as temperature-induced (TILs) and chloroplastic (CHLs) lipocalins (Charron et al., 2005). Sequence, structure and phylogenetic analyses revealed that these proteins share homology with three evolutionary related lipocalins: the bacterial lipocalin Blc, the mammalian apolipoprotein D, and the insect *Lazarillo* protein. The wheat TaCHL gene, the first chloroplast-associated true lipocalin to be isolated, is induced by low temperature and its level of expression is associated with the plant's capacity to develop freezing tolerance. The encoded protein shares 25% identity and 35% similarity with the wheat plasma membrane-associated TaTIL-1 lipocalin. A major difference lies in the presence of a predicted transit peptide at the amino-terminal end

of TaCHL, suggesting that the latter probably accumulates in the chloroplast. TaTIL and TaCHL could therefore have similar functions in different cellular compartments.

In spite of the accumulating knowledge on the molecular features of plant lipocalins, little is known about their function at the cellular and biochemical levels. To help determine the function of plant lipocalins, we have isolated genes encoding homologous proteins in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Using reverse genetic approaches, we recently showed that the *Arabidopsis* plasma membrane-associated AtTIL is involved in modulating tolerance to oxidative and freezing stresses (Charron et al., 2008). The AtTIL knock-out plants are very sensitive to paraquat treatment and etiolated plants die shortly after transfer to light. They also accumulate high levels of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species (ROS). In contrast, AtTIL overexpression enhances tolerance to freezing and paraquat treatments, and to light stress.

The homology between AtTIL and AtCHL suggests that the two proteins could share a similar function at the cellular level. The CHL lipocalins properties, their predicted localization in the chloroplasts, and their accumulation in response to temperature stress in wheat support the hypothesis that these proteins might act as scavengers of potentially harmful molecules induced by temperature stress and excess light. In this work, we characterized knock-out, complementation and overexpression *Arabidopsis* lines to determine the cellular and biochemical functions of the AtCHL lipocalin.

RESULTS

AtCHL is localized in the thylakoid lumen

Homology-based searches allowed us to identify and isolate the wheat *TaCHL* lipocalin and its orthologue *AtCHL* from *Arabidopsis*. Bioinformatics analyses using TargetP and ChloroP predicted that the CHL lipocalins carry an N-terminal chloroplastic transit peptide, suggesting a possible localization in the chloroplasts. To confirm this prediction, intact chloroplasts were isolated and fractionated into their various compartments (Fig. 1A). The immunoblot analysis revealed that AtCHL is specifically localized in the thylakoid lumen of the chloroplast (Fig. 1B). The integrity and purity of the various fractions were assessed by immunoblot analyses with antibodies recognizing proteins that are known to accumulate in the lumen of the thylakoids (plastocyanin, or PC), in the thylakoid membranes (light-harvesting complex IIb, or LhcIIb), or in the stroma (ribulose biphosphate carboxylase small subunit, or RbcS). The data confirmed the purity of the sub-organellar fractions (Fig. 1B).

Effect of abiotic stress treatments on AtCHL accumulation

We investigated the accumulation of AtCHL mRNA and protein in soluble extracts prepared from aerial parts of Wild-Type (WT) Col-0 plants subjected to different stress conditions. The data show that the AtCHL mRNA and protein levels are low when plants are grown under normal, control conditions (CTRL; Figs. 2A and B). A dehydration stress strongly increases AtCHL mRNA and protein levels. A treatment with the oxidant paraquat and high light slightly increases AtCHL expression while NaCl and a heat shock have no effect. Time-course studies indicated that accumulation of both the transcript and protein is rapid following paraquat (oxidative

stress) and dehydration treatments. Absciscic acid (ABA), the hormone showing the closest association with dehydration stress, only has a moderate effect on AtCHL expression (Fig. 2C and D). Interestingly, a low temperature treatment increases the mRNA level but not the protein level (Figs. 2A and B). The wheat TaCHL expression was also shown to be induced by cold but the protein accumulation has never been determined (Charron et al., 2005).

AtCHL increases paraquat and drought tolerance

For functional analyses, we have characterized lines that under- or overexpress the *AtCHL* gene. The only available T-DNA line for *AtCHL* in the SALK collection was obtained from the *Arabidopsis* Biological Resource Center (Alonso et al., 2003). The SALK_133049 line carries one insertion at the 5' end of the first exon of the *AtCHL* gene (At3g47860) (Fig. 3A). As shown in Fig. 3B, WT Col-0 plants show a low level of AtCHL protein accumulation in the total soluble extract from aerial parts while plants of the SALK line show no detectable AtCHL protein accumulation. RT-PCR analysis confirmed that there is no mRNA accumulation in the SALK plants (data not shown), therefore these were considered as knock-out plants (KO). Complementation (Comp) lines of this KO line were generated by constitutive expression of the *AtCHL* cDNA. Overexpressing lines (OEX) were generated by constitutive expression of the *AtCHL* cDNA in the WT Col-0 background. AtCHL protein accumulation in the Comp and OEX lines is much higher than in the WT plants (Fig. 3B). When grown under normal conditions, plants from all lines germinate, develop, flower, and mature similarly, showing that wide variations in AtCHL protein accumulation do not lead to obvious phenotypical differences in control non-stressed plants (Fig. 3C).

Our previous studies indicated that the plasma membrane-associated AtTIL lipocalin increases tolerance to freezing and oxidative stresses (Charron et al., 2008). We thus

determined the effect of dehydration, oxidative and freezing stresses on the various lines. All lines show similar freezing tolerance (data not shown). On the other hand, after 7 days of water deprivation, OEX and Comp lines are much healthier than the WT plants, as revealed by the number and size of the necrotic lesions on leaves (Fig. 4A). This indicates that these plants are more resistant to a dehydration stress. To quantitate stress tolerance, the survival rate was assessed after a 3-day recovery period. A lower survival rate was observed in the KO plants compared to WT, however the difference is not statistically significant (Fig. 4B). In contrast, OEX and Comp plants clearly showed a higher survival rate than the WT and KO. To generate an oxidative stress, plants were treated with paraquat, a herbicide that generates superoxide radicals that react with unsaturated membrane lipids. KO plants showed more necrotic lesions and were markedly more affected than WT plants, whereas OEX and Comp plants were more resistant (Fig. 4C). The phenotypes observed are consistent with the quantitative measurement of survival rate 10 days after paraquat treatment (Fig. 4D).

AtCHL alleviates membrane lipid peroxidation

Our goal was to understand how AtCHL enhances tolerance to oxidative and drought stress. Based on the inverse relationship between stress sensitivity and AtCHL protein levels, and on the mode of action of paraquat, we hypothesized that the chloroplastic lipocalin might be involved in the protection of membranes against the detrimental effects of ROS. We therefore measured lipid peroxidation in plants of the various lines. The data show that the level of malondialdehyde, which is representative of the level of peroxidated lipids, is similar in all lines grown under normal conditions (Fig. 5A). In contrast, KO plants show a higher level of peroxidated lipids when subjected to dehydration or paraquat stress, whereas the OEX and Comp lines clearly have a much lower level of peroxidated lipids (Figs. 5B and C). These data support our

hypothesis that the AtCHL protein prevents lipid peroxidation. In the case of dehydration, this effect is not mediated via ABA since an exogenous ABA treatment alone does not influence the peroxidated lipids level (Fig. 5D).

DISCUSSION

We recently showed that the *Arabidopsis* temperature-induced AtTIL lipocalin extends the vegetative phase, delays ageing and increases oxidative stress tolerance (Charron et al., 2008). Other recent studies showed that overexpression of the human apolipoprotein D lipocalin extends life span and increases oxidative stress resistance in mice and drosophila (Ganforina et al., 2008; Muffat et al., 2008). Unlike these other lipocalins, AtCHL overexpression did not lead to any delay in ageing under normal growth conditions. In addition, plants that do not accumulate AtCHL show no phenotypical changes compared to WT, indicating that the protein is not required for normal growth and development. On the other hand, clear phenotypic differences were observed when plants were subjected to dehydration or oxidative stress conditions. Tolerance to these stresses is associated with the level of AtCHL accumulation. KO plants showed a higher level of peroxidated lipids, resulting in a decrease in tolerance. Complementation of the KO plants decreased the peroxidation of lipids and rescued the tolerance, confirming that the sensitivity is caused by the absence of AtCHL. Plants that accumulate high levels of the protein show much lower levels of peroxidated membrane lipids and a concomitant marked increase in tolerance. It is not known if AtCHL can directly bind membrane lipids, but it has been reported that another lipocalin, the plasma membrane-associated AtTIL, can physical interact with plasma membrane lipids (Tominaga et al., 2006). Interestingly, we found that the wheat lipocalin TaCHL interacts with the lipid transfer protein 3 (Tardif et al., 2007). Members of the lipid transfer protein family are known for their

ability to mediate the *in vitro* transfer of phospholipids between membranes and for their role in plant defense (Boutrot et al., 2008). It remains to be determined if AtCHL binds the *Arabidopsis* LTP3.

Several lines of evidence support the possibility that the chloroplast requires proteins or other molecules to alleviate the damages associated with stress conditions, especially oxidative stress. The chloroplast is the main producer of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the cell. The thylakoid lumen is presumed to accumulate ROS such as superoxide and H_2O_2 (Asada et al., 1983; Mubarakshina et al., 2006; Queval et al., 2008). Intrathylakoidal H_2O_2 formation increases when photosynthetic activity increases as a result of a higher light intensity. There is thus a need for the protection of molecules and structures in the thylakoid lumen. Ascorbate peroxidases are well known for their antioxidant function since they detoxify H_2O_2 (Fryer et al., 2003; Davletova et al., 2005; Rossel et al., 2006), and the existence of a lumenal form of ascorbate peroxidase (Atg4g09010) is consistent with the fact that H_2O_2 is present in this compartment (Peltier et al., 2002). Other members of the antioxidative defence system present in the thylakoid lumen include 2-Cys peroxiredoxine and three m-type thioredoxins (Issakidis-Bourguet et al., 2001; Peltier et al., 2002). Another member, the lumenal violaxanthin deepoxidase (VDE), is a lipocalin-like protein that participates in the protection of photosystem II from excess light by catalyzing the interconversions between the carotenoids violaxanthin, anteraxanthin and zeaxanthin in plants (Hieber et al., 2000). Finally, plastoquinol, a molecule that scavenges superoxide, was suggested to be efficient in preventing the interaction of this destructive agent with membrane lipids and proteins (Mubarakshina et al., 2006). It is however more likely that maximal protection against potential damage from ROS is provided by a combination of proteins such as ascorbate peroxidase, AtCHL and VDE, and other compounds such as plastoquinol.

It is well known that ABA is involved in responses to environmental stress conditions, including a role in drought signaling pathways (Zeevaart and Creelman, 1988; Zhu, 2002; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Endo et al., 2008). Interestingly, ABA increases the generation of H_2O_2 , which leads to an oxidative stress in plant cells and a concomitant induction of the expression of many genes encoding proteins involved in ROS detoxification (Jiang and Zhang, 2001). There is thus some evidence of cross-talks between the dehydration and high light-induced oxidative stress response pathways, and ABA signaling has become increasingly implicated in the regulation of high light-responsive gene expression (Fedoroff, 2002; Fryer et al., 2003; Mullineaux et al., 2006; Rossel et al., 2006). ABA can modulate gene expression (Pandey et al., 2005) via ABA-responsive *cis*-acting elements present in many promoters (Guiltinan et al., 1990). Here we showed that AtCHL is not only expressed under dehydration and oxidative stresses, but also upon ABA treatment, supporting a possible link between these stresses.

Our data lead us to hypothesize that AtCHL's function is to decrease the peroxidation of membrane lipids on the lumenal side of the thylakoids to protect the chloroplast during dehydration and oxidative stresses. ROS peroxidize mostly polyunsaturated fatty acids, and polyunsaturated galactolipids such as monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG) are the most abundant lipid constituents of chloroplast membranes (Torres-Franklin et al., 2007; Aronsson et al., 2008). They therefore represent possible targets of AtCHL protection. Upon dehydration stress of *Arabidopsis*, the relative level of MGDG decreases while that of DGDG increases, resulting in a higher DGDG/MGDG ratio (Gigon et al., 2004). These authors more recently found that this is also the case for drought tolerant cowpea plants, supporting the evidence that an increase in the DGDG/MGDG ratio could allow plants to adapt to drought conditions (Torres-Franklin et al., 2007). A mutant impaired in the synthesis of MGDG (which is an integral part of PSI, PSII and

Cytb6f) accumulates less zeaxanthin and more violaxanthin than WT after HL exposure, and suffers from increased PSII photoinhibition (Aronsson et al., 2008). The authors suggested that this is attributable to an increased conductivity of thylakoid membranes under HL conditions. This would lead to a reduction in proton motive force and a concomitant increase in lumenal pH (around 6.5). This increase in pH would impair VDE and PsbS activity since these proteins require a pH below 6.0 for full activation. Since VDE is involved in one pathway of ABA biosynthesis, it is likely that the MGDG mutant will show a lower level of ABA and be more sensitive to drought stress than WT, but this has not been reported. Other possible targets of AtCHL protection against dehydration and oxidation stresses are the tocotrienols. These are the unsaturated forms of vitamin E, which are lipid-soluble molecules that act as antioxidants to protect unsaturated fatty acids from lipid peroxidation (Matringe et al., 2008). There is thus a possibility that one domain of AtCHL could bind vitamin E derivatives in order to bring them to the chloroplast membranes, where they would prevent membrane lipid peroxidation. Binding analyses are needed to address our hypothesis and determine the AtCHL precise mode of action.

MATERIALS AND METHODS

Plant growth conditions and treatments

Arabidopsis ecotype Columbia (Col-0) was the genetic background of all lines used. The SALK_133049 line (KO) has a T-DNA insertion in the AtCHL gene (At3g47860) and was obtained from the *Arabidopsis* Biological Resource Center (Ohio State Univ.). Seeds were sown on agar plates containing 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin, stratified for 2 days at 4°C and grown at 22°C. Kanamycin-resistant plants were

propagated as individual lines on potting medium consisting of one part vermiculite, one part black earth and one part Pro-mix (Premier).

To generate the complementation (Comp) and overexpressing (OEX) lines, the AtCHL ORF was first cloned into pRTL2, a vector that contains a double cauliflower mosaic virus 35S promoter and a 35S terminator (Restrepo et al., 1990). The resulting Prom_{35S}:AtCHL:Term_{35S} cassette was then cloned into the binary plant expression vector pPZP121 (Hajdukiewicz et al., 1994) and electroporated into the GV3101 *Agrobacterium* strain. KO and WT *Arabidopsis* plants were transformed with this strain using the floral dipping method (Clough and Bent, 1998) to generate the Comp and OEX lines, respectively. To generate a negative control, WT plants were transformed with the pPZP121 vector. Transformed plants were selected by growth on gentamycin-containing medium. Homozygous plants of the fourth generation were used for the experiments.

For soil-grown plants, seeds were sown directly on potting medium, stratified for 3 days at 4°C and grown at 20°C (day/night) with a 16 h photoperiod and photon flux density of 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ for the time indicated in the figure legends. For plate-grown plants, surface-sterilized seeds were plated on sterile half strength Murashige and Skoog medium (Sigma-Aldrich) containing 0.5 g l⁻¹ MES-NaOH pH 5.7, 10 g l⁻¹ sucrose and 7 g l⁻¹ agar. The seeds were stratified and grown under the conditions described above.

Most of the stress treatments were done using soil-grown plants. Control plants were sprayed with distilled water. For the salinity test, plants were watered with a 0.5 M NaCl solution for 4 days. For the oxidative stress treatment, plants were sprayed once until run-off with a 15 μM solution of paraquat (N,N'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride, Sigma-Aldrich) dissolved in water. After spraying, plants were grown for

7 days under normal conditions of temperature and photoperiod. For dehydration, plants grown on soil were watered thoroughly, allowed to drain for one day and water-deprived for 7 days. They were then rehydrated to allow for a 3-day recovery period. For heat shock, plants were treated at 40°C for 1 hour. For low temperature, plants were treated at 4°C for 24 h. For the high light treatment, plants were exposed to 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ for 24 h. For short stress treatments (3 and 6 h), plants were grown on plates and treated with 15 μM paraquat or dehydrated by removing the plants from the agar. For ABA treatment, plants were treated with a 100 μM solution of (\pm)-abscisic acid (ABA; Sigma-Aldrich).

Isolation and fractionation of intact chloroplasts

Intact chloroplasts were isolated and purified on Percoll gradients (Cline, 1986), then fractionated into their sub-organellar constituents (Peltier et al., 2000). All solutions contained Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Chloroplasts (30 mg chlorophyll) were ruptured by osmotic shock in 30 ml of 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM MgCl_2 for 10 min at 4°C. Following centrifugation at 10,000g for 10 min at 4°C, the supernatant contained the soluble stromal and envelope proteins while the pellet contained thylakoids. The proteins in the supernatant were concentrated by TCA precipitation. The thylakoids were washed three times with 10 mM Tris-HCl pH 8.0, and resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl_2 at a chlorophyll concentration of 0.5 mg ml^{-1} , then sonicated 10 times for 30 sec each at 4°C (Sonic Dismembrator Model 500, Fisher Scientific). A centrifugation for 1 h at 145,000g at 4°C resulted in the recovery of the thylakoid membranes in the pellet and the soluble luminal proteins in the supernatant. The latter were concentrated by TCA precipitation. All samples were adjusted with electrophoresis sample buffer and subjected to SDS-PAGE and immunoblot analyses.

Immunoblot and RT-PCR analyses

An anti-AtCHL antibody was raised in rabbit. For this, the AtCHL cDNA was cloned in the pTrc-His vector (Invitrogen) and electroporated into the *E. coli* strain DH5 α . The recombinant His::AtCHL protein was produced by induction with 1 mM IPTG for 3 h. The cells were collected, broken by lysozyme treatment and sonication, and His-tagged proteins were purified by immobilized metal affinity chromatography on Ni-NTA agarose (Novagen). The purified proteins were over 90% pure and used to immunize a rabbit to obtain polyclonal antibodies.

Aerial parts of *Arabidopsis* plants were cut and immediately frozen in liquid nitrogen. One hundred milligrams of leaf material was processed as one sample. Proteins and total RNA were isolated using TRIzol[®] according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). For immunoblot analyses, protein samples were separated on 12% SDS-PAGE gels and detection was performed using the rabbit anti-AtCHL antibody (1:10,000), a peroxidase-coupled anti-rabbit IgG secondary antibody (1:25,000), and the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer). For RT-PCR, total RNA was subjected to reverse transcription using SuperScript[™] III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Primers were designed to specifically amplify the *Arabidopsis* AtCHL (AtCHL-F, TGAAGTAGCTTCTCTTAAGCGTGG and AtCHL-R, ATATATCCATCAGGGCTGCCATGA) and actin control transcripts (Act-F, TCAGATGCCCAGAAGTGTGTT and Act-R, CCGTACAGATCCTTCCTGATA). PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose/ethidium bromide gels.

Lipid peroxidation assays

The levels of peroxidated lipids in plant cells were assayed with the thiobarbituric acid test, which determines the amounts of malondialdehyde as end product of lipid peroxidation (Heath and Packer, 1968; Loreto and Velikova, 2001; Sunkar et al., 2003).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Isobel Parkin (Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon Canada) for the generation of the AtCHL OEX and PromAtCHL:GUS lines. We also thank Prof. Fathey Sarhan (UQAM) and Jean-Benoit F. Charron (yale univ.) for helpful discussions, and Prof. Norman P. Huner (Univ. Western Ontario) for providing the plastocyanin, LhclIb and Rbcs antibodies. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

FIGURES

Figure 1. Subcellular localization of AtCHL. **(A)** Purified intact chloroplasts (1) were lysed and separated into crude thylakoids (2) and soluble stromal and envelope proteins (3). Thylakoids were washed extensively (4) then sonicated. Thylakoids membranes (5) and soluble luminal proteins (6) were collected by centrifugation. **(B)** Immunoblot analyses of chloroplast subfractions. Antisera against various marker proteins were used to assess the purity of the fractions. AtCHL, *Arabidopsis* chloroplastic lipocalin; PC, luminal plastocyanin protein; LhcIIb, integral thylakoid membrane LhcIIb protein; RbcS, stromal ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit protein. The lane numbers correspond to the numbers in the purification scheme shown in (A).

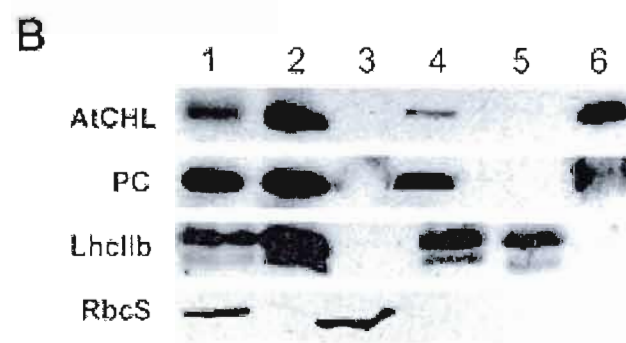
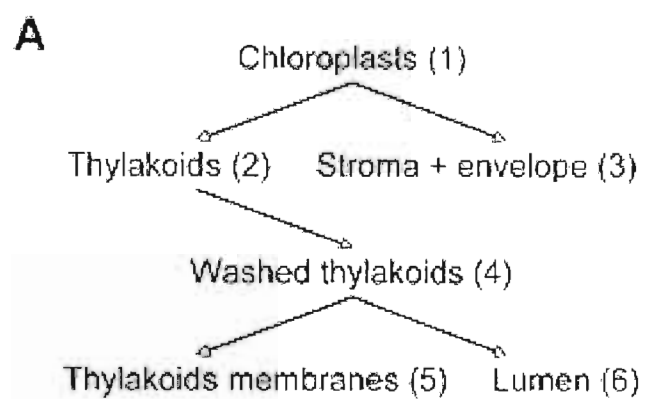


Figure 2. Effect of abiotic stresses on the expression of AtCHL. **(A)** AtCHL transcript accumulation in leaf extracts of soil-grown WT Col-0 plants after various stress treatments. Total RNA was extracted from aerial parts and mRNA was detected by RT-PCR. Actin mRNA was used as an internal control. **(B)** AtCHL protein level after various stress treatments. Top panel: Immunoblot analysis with the rabbit polyclonal anti-AtCHL antibody. Bottom panel: CBB-stained gel. **(C)** AtCHL transcript accumulation in leaf extracts of plate-grown WT Col-0 plants before (0 h) and after 3 or 6 hours (3 h and 6 h) of short stress treatments. Total RNA was extracted from aerial parts and mRNA was detected by RT-PCR. Actin mRNA was used as an internal control. **(D)** AtCHL protein level after various stress treatments. Top panel: Immunoblot analysis with the rabbit polyclonal anti-AtCHL antibody. Bottom panel: CBB-stained gel. CTRL, control non-treated plant; NaCl, high salt treatment; Paraquat, oxidative stress treatment; DH, dehydration treatment; HS, heat shock; LT, low temperature; HL, high light; ABA, abscisic acid.

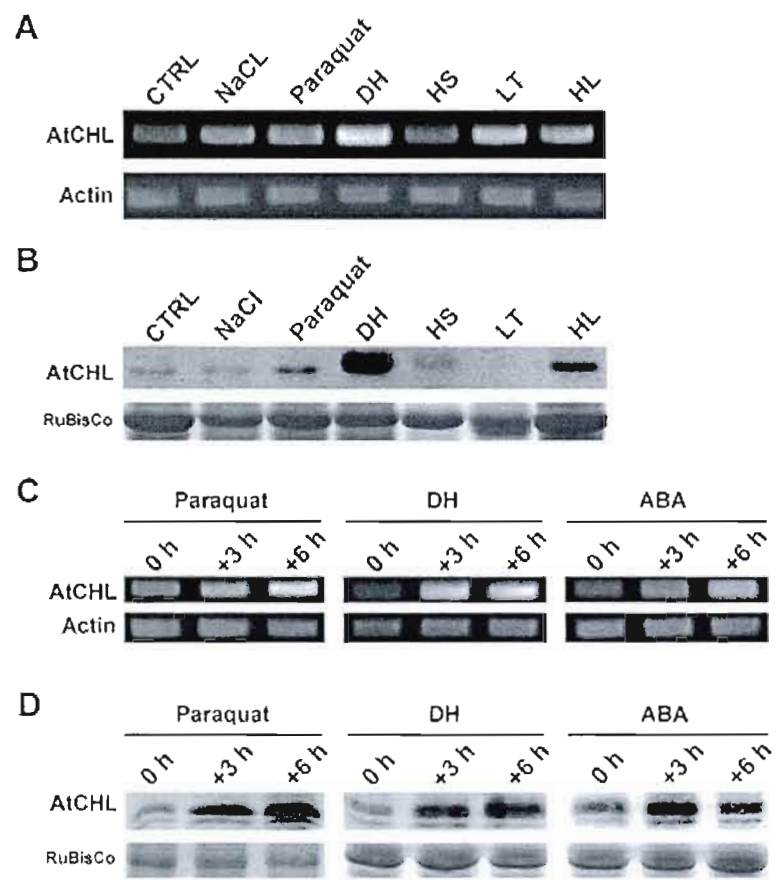


Figure 3. Modulation of the AtCHL protein level and phenotypic analysis. **(A)** Genomic organization of an *Arabidopsis* SALK line carrying a T-DNA insertion in the AtCHL gene (At3g47860). Boxes 1 to 5 are exons. **(B)** AtCHL protein levels in leaf extracts. Top panel: Immunoblot analysis with a rabbit anti-AtCHL antibody. Bottom panel: Coomassie Brilliant Blue-stained gel. **(C)** Plants were grown under normal conditions of temperature and photoperiod for 21, 28 and 35 days. Col-0, wild-type (WT) Columbia-0 plants; *Atchl-1*, knock-out (KO) SALK_133049 line; *Atchl-1 35S:AtCHL*, KO plant complemented by overexpression of AtCHL; *35S:AtCHL*, an AtCHL overexpressing line; pPZP121, WT transformed with the empty binary vector (negative control).

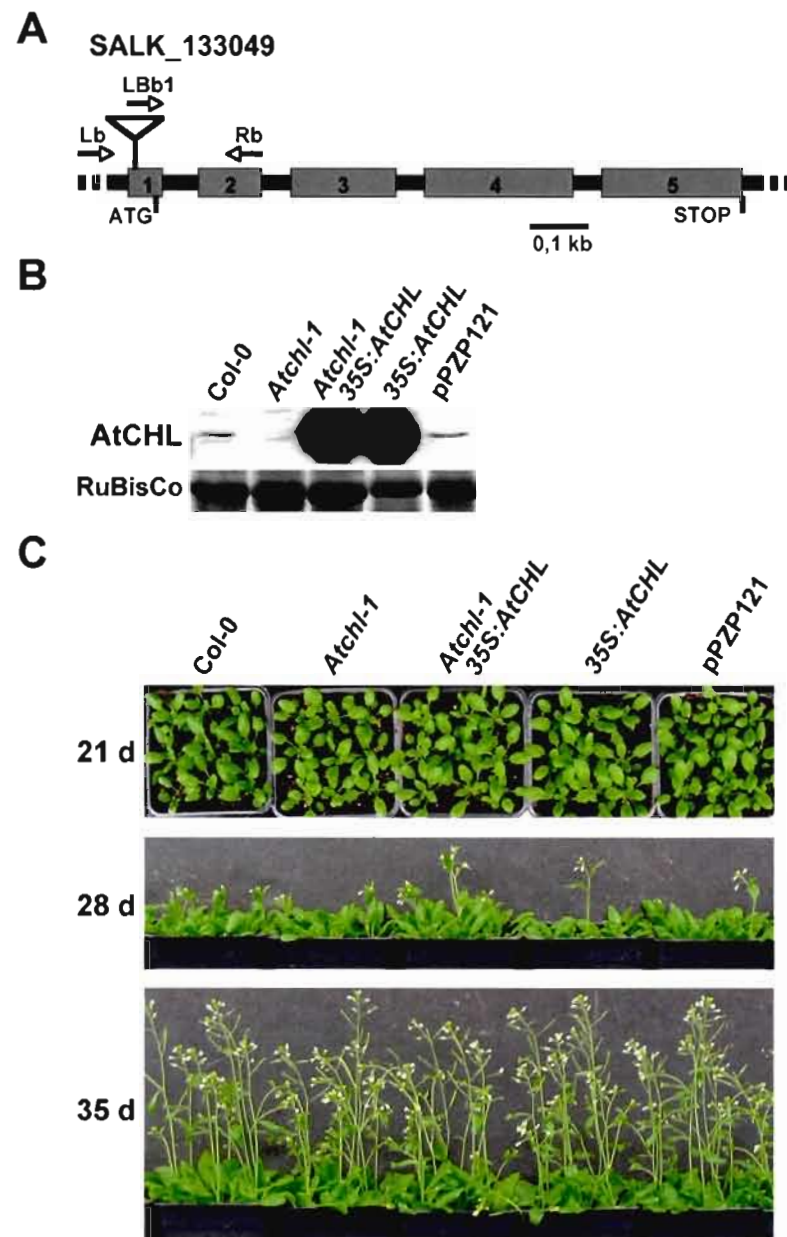


Figure 4. Effect of dehydration and oxidative stresses on the different *Arabidopsis* lines. **(A)** Plants were grown under normal conditions for 3 weeks and then watered thoroughly. They were allowed to drain for one day (0 d), deprived of water for 7 days (+7 d) and then rehydrated to allow for a 3-day recovery period (recov.). **(B)** Survival rate of plants after 3 days of recovery following 7 days of dehydration, expressed as a percentage of surviving plants. **(C)** Plants were grown under normal conditions for 3 weeks and then sprayed until run off with a 15 μ M paraquat solution. Pictures were captured at the indicated time after treatment. **(D)** Survival rate of plants 10 days after paraquat treatment, expressed as a percentage of surviving plants. Col-0, wild-type (WT) Columbia-0 plants; *Atchl-1*, knock-out (KO) SALK_133049 line; *Atchl-1 35S:AtCHL*, KO plant complemented by overexpression of AtCHL; *35S:AtCHL*, an AtCHL overexpressing line; pPZP121, WT transformed with the empty binary vector (negative control).

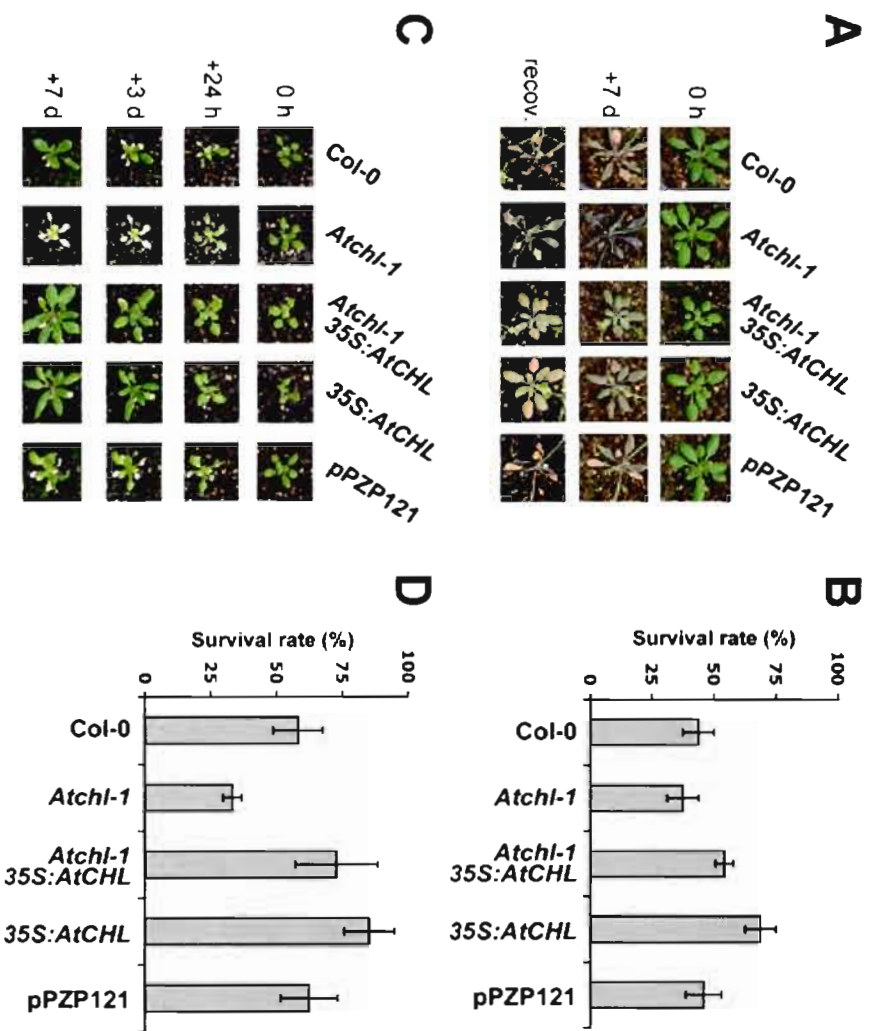
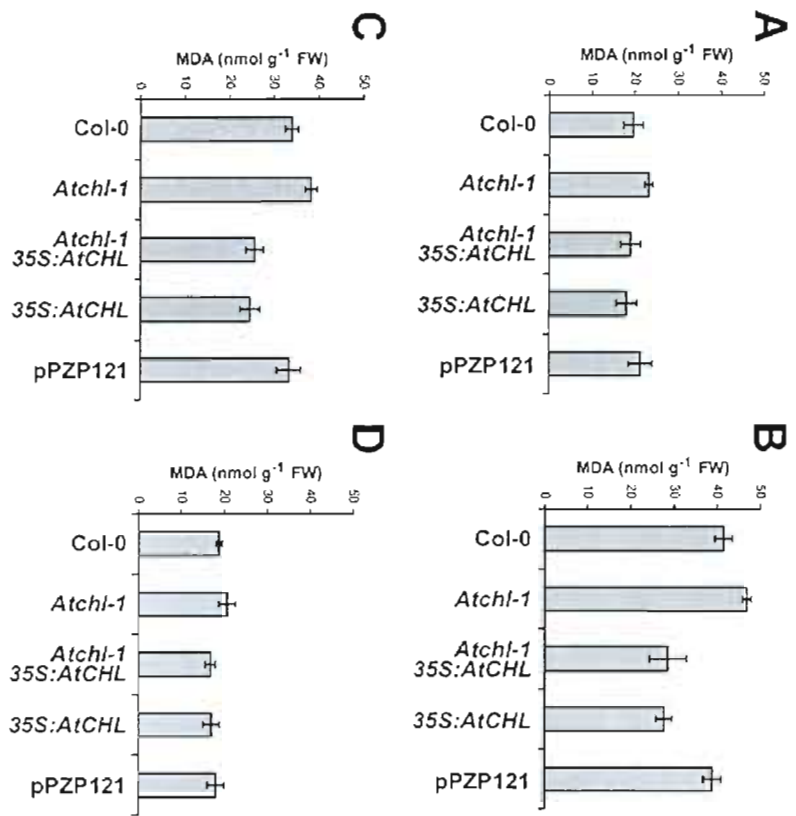


Figure 5. Lipid peroxidation assays. Plant were grown under normal conditions for 3 weeks and then mock-treated **(A)**, dehydrated for 3 h **(B)**, treated for 3 h with 40 μ M paraquat **(C)**, or treated for 3 h with 100 μ M ABA **(D)**. Plants were ground and malondialdehyde accumulation was measured. Col-0, wild-type (WT) Columbia-0 plants; *Atchl-1*, knock-out (KO) SALK_133049 line; *Atchl-1 35S:AtCHL*, KO plant complemented by overexpression of AtCHL; *35S:AtCHL*, an AtCHL overexpressing line; pPZP121, WT transformed with the empty binary vector (negative control).



CONCLUSION

Les résultats de plusieurs études suggèrent que les lipocalines auraient une implication dans le stress oxydatif. Dans cette étude, nous avons démontré que la lipocaline chloroplastique AtCHL chez *Arabidopsis* s'accumule spécifiquement dans le lumen des thylacoïdes. Il a été suggéré que ce compartiment accumule les espèces réactives d'oxygène (ROS) lors du débalancement de la photosynthèse en conditions de stress abiotique. D'autres membres du système de défense contre le stress oxydatif se retrouvent aussi dans le lumen mais leur implication reste à vérifier. Les résultats obtenus dans la présente étude permettent d'ajouter AtCHL comme un membre potentiellement important du système de défense contre les ROS. En effet, nos résultats suggèrent que la fonction d'AtCHL est de diminuer la peroxydation des lipides de la face luménale de la membrane thylacoïdale, afin de protéger le chloroplaste pendant le stress de sécheresse et le stress oxydatif.

AtCHL pourrait lier les lipides et avoir un rôle de protection direct, ou encore indirect par la coopération avec d'autres protéines présentes dans le lumen. D'ailleurs, une étude récente montre que TaCHL chez *Triticum aestivum* interagit avec un membre de la famille des "lipid transfer protein" (LTP). L'interaction entre ces deux protéines pourrait aussi bien s'effectuer chez *Arabidopsis thaliana* mais ceci reste à démontrer. Ainsi, le mode d'action des lipocalines CHLs pourrait être d'assurer la protection des lipides lors de leur transfert effectué par les LTP, afin de remplacer les membranes endommagées par les ROS générées en conditions de stress. Il est aussi possible que CHL ait la possibilité de récupérer les lipides endommagés (par exemple par oxydation) dans les membranes lors du stress et de les transférer grâce aux LTPs vers d'autres compartiments cellulaires à des fins de détoxification.

Les niveaux de protéine AtCHL augmentent lors du traitement au paraquat, à la sécheresse et à haute intensité lumineuse (HL). Il est très intéressant qu'AtCHL soit aussi exprimé en réponse à la phytohormone ABA. La signalisation de l'ABA cause l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués autant dans le stress HL que dans le stress hydrique, deux stress abiotiques qui génèrent une grande quantité de ROS dans le chloroplaste des cellules. Les résultats de cette étude appuient l'existence de similitudes entre les mécanismes de tolérance envers ces deux stress et met l'accent sur le lien de plus en plus certain entre le potentiel hydrique des feuilles et la capacité à dissiper l'excès d'énergie lumineuse (Fryer et al., 2003; Bechtold et al., 2008).

Afin de mieux comprendre les mécanismes de tolérance au stress de sécheresse et au stress oxydatif, il serait intéressant de vérifier le niveau de tolérance au stress de hautes intensités lumineuses des différentes lignées caractérisées dans l'étude présente. Puisque le niveau de lipides peroxydés semble moins élevé dans les plantes qui ont un niveau plus élevé de protéine AtCHL, il serait approprié d'étudier la liaison spécifique entre AtCHL et des lipides typiques du chloroplaste. Ceci pourrait permettre de vérifier si AtCHL est impliquée dans la protection des lipides du chloroplaste contre le stress oxydatif par une liaison directe avec ceux-ci. Finalement, dans l'étude future du mécanisme d'action d'AtCHL, il serait avantageux de vérifier si AtCHL permet de détoxiquer directement les ROS, et si oui, quelle est la nature de ces ROS.

Grâce à cette étude, l'importance des lipocalines dans la tolérance aux stress abiotiques est une fois de plus démontrée. Il devient clair que peu importe la phylogénie ou la localisation cellulaire des lipocalines, ces dernières montrent une conservation de fonction dans la tolérance au stress oxydatif. Étant donné le nombre limité de protéines luminales et l'intérêt que représente l'étude du chloroplaste dans

la communauté scientifique, les informations recueillies dans cette étude ajoutent à nos connaissances du métabolisme des plantes.

RÉFÉRENCES

- Akerstrom B, Flower DR et Salier JP. 2000. «Lipocalins: unity in diversity». *Biochim Biophys Acta* 1482: 1-8.
- Åkerstrom B et Logdberg L. 2006. « α 1-Microglobulin. In Lipocalins». In Lipocalins. Åkerstrom B, Borregaard N, Flower DR et Salier JP, eds. pp 110-120. Georgetown TX. Landes Bioscience.
- Allhorn M, Klapysa A et Akerstrom B. 2005. «Redox properties of the lipocalin α 1-microglobulin: reduction of cytochrome c, hemoglobin, and free iron». *Free Radic Biol Med* 38: 557-567.
- Allhorn M, Lundqvist K, Schmidtchen A et Akerstrom B. 2003. «Heme-scavenging role of α 1-microglobulin in chronic ulcers». *J Invest Dermatol* 121: 640-646.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC et Ecker JR. 2003. «Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*». *Science* 301: 653-657.
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA et Lamb C. 1998. «Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity». *Cell* 92: 773-784.
- Aronsson H, Schottler MA, Kelly AA, Sundqvist C, Dormann P, Karim S et Jarvis P. 2008. «Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in *Arabidopsis* affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves». *Plant Physiol* 148: 580-592.
- Asada K. 1999. «The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639.
- Asada K, Takahashi M et Hayakawa T. 1983. «Photoproduction of superoxide in membranes of chloroplast thylakoids and intrachloroplast distribution of

- superoxide dismutase». In Oxy radicals and their scavenger systems. Greenwald R et Cohen G, eds, Vol 1. pp 240-245. St-Louis MO. Elsevier Science Publishing Co.
- Bartels D et Nelson D. 1994. «Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics». *Plant Cell Environ* 17: 659-667.
- Bechtold U, Richard O, Zamboni A, Gapper C, Geisler M, Pogson B, Karpinski S et Mullineaux PM. 2008. «Impact of chloroplastic- and extracellular-sourced ROS on high light-responsive gene expression in *Arabidopsis*». *J Exp Bot* 59: 121-133.
- Bishop RE. 2000. «The bacterial lipocalins». *Biochim Biophys Acta* 1482: 73-83.
- Bohnert HJ, Nelson DE et Jensen RG. 1995. «Adaptations to environmental stresses». *Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Boutrot F, Chantret N et Gautier MF. 2008. «Genome-wide analysis of the rice and *Arabidopsis* non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining». *BMC Genomics* 9: 86.
- Boyer JS. 1982. «Plant productivity and environment». *Science* 218: 443-448.
- Chang CC, Ball L, Fryer MJ, Baker NR, Karpinski S et Mullineaux PM. 2004. «Induction of *ASCORBATE PEROXIDASE 2* expression in wounded *Arabidopsis* leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis». *Plant J* 38: 499-511.
- Charron JB, Ouellet F, Houde M et Sarhan F. 2008. «The plant Apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress». *BMC Plant Biol* 8: 86.
- Charron JB, Ouellet F, Pelletier M, Danyluk J, Chauve C et Sarhan F. 2005. «Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins». *Plant Physiol* 139: 2017-2028.
- Charron JBF et Sarhan F. 2006. «Plant lipocalins». In Lipocalins. Åkerström B et Lögberg L, eds. pp 41-48. Georgetown TX. Landes Bioscience.
- Chaves MM, Flexas J et Pinheiro C. 2008. «Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell». *Ann Bot (Lond)* doi:10.1093/aob/mcn125.

- Cline K. 1986. «Import of proteins into chloroplasts. Membrane integration of a thylakoid precursor protein reconstituted in chloroplast lysates». *J Biol Chem* 261: 14804-14810.
- Clough SJ et Bent AF. 1998. «Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*». *Plant J* 16: 735-743.
- Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K et Mittler R. 2005. «Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*». *Plant Cell* 17: 268-281.
- de Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez Egea P, Bogre L et Grant M. 2007. «*Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease». *EMBO J* 26: 1434-1443.
- Douliez JP, Michon T, Elmorjani K et Marion D. 2000. «Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels». *J Cereal Sci* 32: 1-20.
- Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koiwai H, Seo M, Toyomasu T, Mitsuhashi W, Shinozaki K, Nakazono M, Kamiya Y, Koshiba T et Nambara E. 2008. «Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells». *Plant Physiol* 147: 1984-1993.
- Fedoroff NV. 2002. «Cross-talk in abscisic acid signaling». *Sci STKE* 2002: RE10.
- Finkelstein RR, Gampala SS et Rock CD. 2002. «Abscisic acid signaling in seeds and seedlings». *Plant Cell* 14: S15-45.
- Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G et Sharkey TD. 2004. «Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants». *Plant Biol (Stuttg)* 6: 269-279.
- Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmes J, Kaldenhoff R, Medrano H et Ribas-Carbo M. 2007. «Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves». *Plant Cell Environ* 30: 1284-1298.
- Flower DR. 1995. «Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family». *J Mol Recognit* 8: 185-195.

- Flower DR. 1996. «The lipocalin protein family: structure and function». *Biochem J* 318 (Pt 1): 1-14.
- Flower DR. 2000. «Beyond the superfamily: the lipocalin receptors». *Biochim Biophys Acta* 1482: 327-336.
- Flower DR, North AC et Attwood TK. 1993. «Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins». *Protein Sci* 2: 753-761.
- Flower DR, North AC et Sansom CE. 2000. «The lipocalin protein family: structural and sequence overview». *Biochim Biophys Acta* 1482: 9-24.
- Foyer CH et Noctor G. 2005. «Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses». *Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Frenette Charron JB, Breton G, Badawi M et Sarhan F. 2002. «Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and *Arabidopsis*». *FEBS Lett* 517: 129-132.
- Fryer MJ, Ball L, Oxborough K, Karpinski S, Mullineaux PM et Baker NR. 2003. «Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves». *Plant J* 33: 691-705.
- Fryer MJ, Oxborough K, Mullineaux PM et Baker NR. 2002. «Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves». *J Exp Bot* 53: 1249-1254.
- Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, Gonzalez C, Bastiani MJ, Rassart E et Sanchez D. 2008. «Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress». *Aging Cell* 7: 506-515.
- Ganfornina MD, Gutierrez G, Bastiani M et Sanchez D. 2000. «A phylogenetic analysis of the lipocalin protein family». *Mol Biol Evol* 17: 114-126.
- Gigon A, Matos AR, Laffray D, Zuily-Fodil Y et Pham-Thi AT. 2004. «Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia)». *Ann Bot (Lond)* 94: 345-351.
- Guan LM, Zhao J et Scandalios JG. 2000. «Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and

- osmotic stress: H_2O_2 is the likely intermediary signaling molecule for the response». *Plant J* 22: 87-95.
- Guiltinan MJ, Marcotte WRJ et Quatrano RS. 1990. «A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element». *Science* 250: 267-271.
- Gutierrez G, Ganfornina MD et Sanchez D. 2000. «Evolution of the lipocalin family as inferred from a protein sequence phylogeny». *Biochim Biophys Acta* 1482: 35-45.
- Hajdukiewicz P, Svab Z et Maliga P. 1994. «The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation». *Plant Mol Biol* 25: 989-994.
- Havaux M et Kloppstech K. 2001. «The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants». *Planta* 213: 953-966.
- Heath RL et Packer L. 1968. «Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation». *Arch Biochem Biophys* 125: 189-198.
- Hieber AD, Bugos RC et Yamamoto HY. 2000. «Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase». *Biochim Biophys Acta* 1482: 84-91.
- Huang D, Wu W, Abrams SR et Cutler AJ. 2008. «The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors». *J Exp Bot* 59: 2991-3007.
- Issakidis-Bourguet E, Mouaheb N, Meyer Y et Miginiac-Maslow M. 2001. «Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin». *Plant J* 25: 127-135.
- Ivanov B et Khorobrykh S. 2003. «Participation of photosynthetic electron transport in production and scavenging of reactive oxygen species». *Antioxid Redox Signal* 5: 43-53.
- Jiang M et Zhang J. 2001. «Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings». *Plant Cell Physiol* 42: 1265-1273.

- Jones HG et Jones MB. 1989. «Introduction : Some terminology and common mechanisms ». In *Plants Under Stress*. Jones HG, Flowers TJ et Jones MB, eds. pp 1-10. Cambridge UK. Cambridge University Press.
- Kader JC, Julienne M et Vergnolle C. 1984. «Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts». *Eur J Biochem* 139: 411-416.
- Kaminaka H, Morita S, Tokumoto M, Masumura T et Tanaka K. 1999. «Differential gene expressions of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses». *Free Radic Res* 31 Suppl: S219-225.
- Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G et Mullineaux PM. 1997. «Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress». *Plant Cell* 9: 627-640.
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G et Mullineaux P. 1999. «Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*». *Science* 284: 654-657.
- Kawamura Y et Uemura M. 2003. «Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation». *Plant J* 36: 141-154.
- Krieger-Liszkay A et Trebst A. 2006. «Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre». *J Exp Bot* 57: 1677-1684.
- Larsson J, Allhorn M et Kerstrom B. 2004. «The lipocalin α 1-microglobulin binds heme in different species». *Arch Biochem Biophys* 432: 196-204.
- Lawlor DW et Cornic G. 2002. «Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants». *Plant Cell Environ* 25: 275-294.
- Loreto F et Velikova V. 2001. «Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes». *Plant Physiol* 127: 1781-1787.
- Mahajan S et Tuteja N. 2005. «Cold, salinity and drought stresses: an overview». *Arch Biochem Biophys* 444: 139-158.

- Mateo A, Muhlenbock P, Rusterucci C, Chang CC, Miszalski Z, Karpinska B, Parker JE, Mullineaux PM et Karpinski S. 2004. «LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy». *Plant Physiol* 136: 2818-2830.
- Matringe M, Ksas B, Rey P et Havaux M. 2008. «Tocotrienols, the unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves». *Plant Physiol* 147: 764-78.
- Mittler R. 2002. «Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance». *Trends Plant Sci* 7: 405-410.
- Mubarakshina M, Khorobrykh S et Ivanov B. 2006. «Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane». *Biochim Biophys Acta* 1757: 1496-1503.
- Muffat J, Walker DW et Benzer S. 2008. «Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*». *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7088-7093.
- Mullineaux PM, Karpinski S et Baker NR. 2006. «Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants». *Plant Physiol* 141: 346-350.
- Nambara E, Kawaide H, Kamiya Y et Naito S. 1998. «Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration». *Plant Cell Physiol* 39: 853-858.
- Orozco-Cardenas M et Ryan CA. 1999. «Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway». *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6553-6557.
- Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J et Ryan CA. 2001. «Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate». *Plant Cell* 13: 179-191.
- Ort DR et Baker NR. 2002. «A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis?». *Curr Opin Plant Biol* 5: 193-198.
- Pandey GK, Grant JJ, Cheong YH, Kim BG, Li L et Luan S. 2005. «ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in *Arabidopsis*». *Plant Physiol* 139: 1185-1193.

- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E et Schroeder JI. 2000. «Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells». *Nature* 406: 731-734.
- Peltier JB, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles DA, Soderberg L, Roepstorff P, von Heijne G et van Wijk KJ. 2002. «Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction». *Plant Cell* 14: 211-236.
- Peltier JB, Friso G, Kalume DE, Roepstorff P, Nilsson F, Adamska I et van Wijk KJ. 2000. «Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins». *Plant Cell* 12: 319-341.
- Peltier JB, Ytterberg AJ, Sun Q et van Wijk KJ. 2004. «New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy». *J Biol Chem* 279: 49367-49383.
- Pervaiz S et Brew K. 1985. «Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC». *Science* 228: 335-337.
- Queval G, Hager J, Gakiere B et Noctor G. 2008. «Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts». *J Exp Bot* 59: 135-146.
- Restrepo MA, Freed DD et Carrington JC. 1990. «Nuclear transport of plant potyviral proteins». *Plant Cell* 2: 987-998.
- Rossel JB, Walter PB, Hendrickson L, Chow WS, Poole A, Mullineaux PM et Pogson BJ. 2006. «A mutation affecting *ASCORBATE PEROXIDASE 2* gene expression reveals a link between responses to high light and drought tolerance». *Plant Cell Environ* 29: 269-281.
- Sakamoto A, Okumura T, Kaminaka H, Sumi K et Tanaka K. 1995. «Structure and differential response to abscisic acid of two promoters for the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase genes, *SodCc1* and *SodCc2*, in rice protoplasts». *FEBS Lett* 358: 62-66.
- Salier JP. 2000. «Chromosomal location, exon/intron organization and evolution of lipocalin genes». *Biochim Biophys Acta* 1482: 25-34.

- Sanchez D, Ganfornina M, Gutierrez G, Gauthier-Jauneau A, Risler J et Salier J. 2006. «Lipocalins genes and their evolutionary history». In Lipocalins. Akerström B et Lögdberg L, eds. pp 5-16. Georgetown TX. Landes Bioscience.
- Sanchez D, Lopez-Arias B, Torroja L, Canal I, Wang X, Bastiani MJ et Ganfornina MD. 2006. «Loss of glial lazaro, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*». *Curr Biol* 16: 680-686.
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM et Waner D. 2001. «Guard cell signal transduction». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 627-658.
- Schwartz SH, Qin X et Zeevaart JA. 2003. «Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes». *Plant Physiol* 131: 1591-1601.
- Seo M et Koshida T. 2002. «Complex regulation of ABA biosynthesis in plants». *Trends Plant Sci* 7: 41-48.
- Shinozaki K et Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. «Gene networks involved in drought stress response and tolerance». *J Exp Bot* 58: 221-227.
- Steponkus PL. 1984. «Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 35: 543-584.
- Sterk P, Booy H, Schellekens GA, Van Kammen A et De Vries SC. 1991. «Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene». *Plant Cell* 3: 907-921.
- Sunkar R, Bartels D et Kirch HH. 2003. «Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance». *Plant J* 35: 452-464.
- Tardif G, Kane NA, Adam H, Labrie L, Major G, Gulick P, Sarhan F et Laliberté JF. 2007. «Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat». *Plant Mol Biol* 63: 703-718.
- Tominaga Y, Nakagawara C, Kawamura Y et Uemura M. 2006. «Effect of plasma membrane-associated proteins on acquisition of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*». In Cold hardiness in plants. Molecular genetics, cell biology and physiology. Chen THH, Uemura M et Fujikawa S, eds. pp 235-249. Cambridge MA. CABI Publishing.

- Torres-Franklin ML, Gigon A, de Melo DF, Zuily-Fodil Y et Pham-Thi AT. 2007. «Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves». *Physiol Plant* 131: 201-210.
- Walker DW, Muffat J, Rundel C et Benzer S. 2006. «Overexpression of a *Drosophila* homolog of apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan». *Curr Biol* 16: 674-679.
- Xiong L, Wang RG, Mao G et Koczan JM. 2006. «Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid». *Plant Physiol* 142: 1065-1074.
- Xiong L et Zhu JK. 2003. «Regulation of abscisic acid biosynthesis». *Plant Physiol* 133: 29-36.
- Zeevaart JAD et Creelman RA. 1988. «Metabolism and physiology of abscisic acid». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 439-473.
- Zhu JK. 2002. «Salt and drought stress signal transduction in plants». *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273.